

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Zkoumání cytotoxicity vybraných xenobiotik

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. František Trejtnar, Csc.

Hradec Králové, 2011

Olga Stehnová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tuto práci jsem nepoužila k získání stejného nebo jiného titulu.“

Datum:

Podpis:

Dovoluji si vyjádřit poděkování váženému Doc. PharmDr. Františku Trejtnarovi za ochotu, pomoc, připomínky, rady a náměty při zpracování této práce. Také děkuji za spolupráci a rady při laboratorní práci Mgr. Janě Mandíkové.

OBSAH

1	Abstrakt	5
	Abstract	6
2	Zadání práce	7
3	Úvod	8
4	Teoretická část	9
4.1	Význam hodnocení cytotoxicity	10
4.2	Buněčné funkce hodnocené v testech cytotoxicity	11
4.2.1	Ovlivnění buněčného jádra a proliferace	11
4.2.2	Ovlivnění buněčné membrány a transportu	11
4.2.3	Ovlivnění mitochondrií a energetické homeostázy	12
4.2.4	Reaktivní metabolity, oxidační stres a zprostředkovaná imunita	12
4.2.5	Lyzosomální funkce a autofagie	13
4.2.6	Systém regulace vápníku	13
4.3	Experimentální modely pro testování hepatotoxicity	14
4.4	Principy použité metody stanovení cytotoxicity	18
4.5	Testované látky	20
4.5.1	Deriváty 5,6-substituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů	20
4.5.2	Látky ze skupiny chitosanů	20
5	Experimentální část	24
5.1	Materiál	25
5.1.1	Použitý buněčný model	25
5.1.2	Přístroje a zařízení	25
5.1.3	Další použitý materiál	25
5.1.4	Chemikálie	26
5.1.5	Testované látky	26
5.2	Metoda	27
5.2.1	Vyhodnocení naměřených dat	30
5.2.2	Mikroskopické zobrazení cytotoxického účinku	30
5.3	Výsledky	31
5.3.1	Stanovení cytotoxicity derivátů substituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů	31
5.3.2	Stanovení cytotoxicity derivátů chitosanů	38
6	Diskuse	41
7	Shrnutí závěrů práce	45
8	Zkratky	46
9	Použitá literatura	47

1 ABSTRAKT

Předmětem diplomové práce bylo posouzení cytotoxicity vybraných xenobiotik *in vitro* s využitím vhodného buněčného modelu. Cílem bylo zjistit možné cytotoxické působení potenciálních antiinfekčních látek ze dvou chemických skupin. První skupinu představují zástupci nově syntetizovaných derivátů substituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů (ZIP-34, ZIP-128, ZIP-130 a ZIP-136). Druhou skupinou jsou deriváty chitosanu s navázanými antituberkuloticky účinnými látkami (Chi-2-SP a Chi-7). Testované vzorky byly dodány z Katedry organické a anorganické chemie a Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

Pro zjištění cytotoxicity byla použita standardní kolorimetrická metoda založená na hodnocení metabolického stavu buněk. Jako experimentální model pro zkoumání jaterní toxicity byla vybrána standardní linie lidských jaterních buněk HepG2. Jako parametr pro posouzení cytotoxicity testovaných látek byly stanovovány hodnoty IC_{50} .

Hodnoty IC_{50} se podařilo určit u všech čtyř látek ze skupiny ZIPů. Nejvyšší toxicitu u jaterních buněk HepG2 vykazoval ZIP-128 a nejnižší ZIP-136. Celkově ale provedené testy prokázaly, že hodnoty IC_{50} jsou velmi podobné a řádově se v dané skupině sloučenin podstatně neodlišují. Cytotoxický účinek derivátů chitosanu byl relativně nízký, hodnotu IC_{50} u testovaného derivátu chitosanu Chi-7 se dokonce nepodařilo jednoznačně určit, neboť ve zkoumaném rozsahu koncentrací neprojevil signifikantní cytotoxické působení. Tuto látku lze tedy pokládat za relativně netoxickou.

ABSTRACT

The subject of the work was to evaluate the *in vitro* cytotoxicity of selected xenobiotics using a suitable cellular model. The aim was to determine a possible cytotoxic effect of potential antiinfective compounds from two different chemical groups. The first group includes representatives of the newly synthesized derivatives of substituted pyrazin-2,3-dikarbonitril (ZIP-34, ZIP-128, ZIP-130 a ZIP-136) and the second group is made of derivatives of chitosan with bound antituberculous active substances (Chi-2-SP and Chi-7). The tested samples were supplied by the Department of Organic and Inorganic Chemistry and Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague.

To determine the cytotoxicity, a standard colorimetric method based on an evaluation of the metabolic state of cells was used. As the experimental model for assessment of hepatotoxicity the standard human hepatic cell line HepG2 was selected. As the parameter for assessment of cytotoxicity of the tested compounds the values IC_{50} were measured.

The values IC_{50} were identified for all substances from the group of ZIPs. The highest toxicity was found for ZIP-128 and the lowest for ZIP-136. But overall, the performed tests showed that the values IC_{50} are very similar and they do not differ substantially among compounds in this group. The cytotoxic effect of chitosan derivatives was relatively low, the value IC_{50} of the tested derivative Chi-7 could even not be determined since it showed in the examined concentration range no significant cytotoxic activity. This substance thus can be considered to be relatively non-toxic.

2 ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo stanovení cytotoxického potenciálu vybraných xenobiotik s využitím vhodného buněčného modelu. Testovány byly dvě skupiny látek – substituované deriváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilů a deriváty chitosanu. Úkolem bylo také zpracovat teoretické informace z oblasti bezprostředně se týkající hlavní problematiky řešené v této diplomové práci, a tedy shrnout význam cytotoxicity, zpracovat přehled buněčných linií používaných v testech cytotoxicity, osvětlit princip použité metody a charakterizovat testované látky.

3 ÚVOD

Tématem této diplomové práce bylo zkoumání toxicity vybraných xenobiotik. Testovány byly dvě skupiny nově syntetizovaných látek s potencionálně antimikrobiálním účinkem. První skupinu představují substituované deriváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilu, druhou zastupují látky typu derivátů chitosanu.

Od 70. let 20. století byla intenzivně studována role jednoduchých látek odvozených od pyrazinu v přírodě, především v rostlinách či hmyzu, kde těkavé pyraziny plní úlohu atraktantů, feromonů či signálních látek. Synteticky připravené pyraziny vykazují rovněž celou škálu farmakologických účinků. Řada z nich se používá jako důležitá léčiva. V současné době jsou deriváty pyrazinu intenzivně studovány pro jejich antiinfekční (antibakteriální, antifungální a antituberkulotické) účinky, které byly dosud nejvíce nalezeny právě ve skupině derivátů pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (Doležal, 2006). Druhá testovaná skupina látek je zastoupena deriváty chitosanu, jež jsou v současnosti studovány jako antituberkulotika s potencionálně nižším toxickým účinkem (Vavříková et al., 2011). U těchto obou skupin nově vyvinutých látek představuje testování cytotoxicity základní proceduru zahrnutou ve vývoji nových sloučenin před jejich dalším farmakologickým testováním.

K posouzení toxicity jednotlivých látek jsme využili buněčného modelu HepG2, který představuje standardní linii lidských jaterních buněk. Jako parametr toxického působení byla pro každou testovanou látku stanovována hodnota IC_{50} . Tento základní toxikologický parametr představuje inhibiční koncentraci potřebnou ke snížení životnosti buněk na 50% hodnoty maximální (kontrolní) životnosti. Pro testování toxicity jsme použili standardních metod a před vlastním testováním byla provedena rozsáhlá optimalizace stanovení cytotoxicity a z řady dostupných testů jsme zvolili nejlépe proveditelný postup maximálně odpovídající požadovaným cílům.

4 TEORETICKÁ ČÁST

4.1 Význam hodnocení cytotoxicity

Posouzení toxikologického rizika látek pro člověka se z etických důvodů omezujících testování na člověku opírá o data získaná z toxikologických experimentů na zvířatech, z neoficiálních zpráv o lidech náhodně vystavených toxickému působení chemikálií, z epidemiologických studií exponovaných skupin obyvatel a z klinických hodnocení léčiv a jejich post-marketingového sledování. Extrapolace údajů zjištěných u zvířat je však komplikována výraznými mezidruhovými rozdíly v metabolismu cizorodých látek. Toto je zvláště důležité u metabolismem zprostředkované toxicity, kdy mezi člověkem a nejčastěji používanými zvířecími modely jsou rozdíly v substrátové specifitě a indukovatelnosti enzymů metabolizujících xenobiotika, např. izoenzymy cytochromu P450 (CYP). Kromě rozdílů ve farmakokinetice (absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece), lze pozorovat také značné mezidruhové odlišnosti v distribuci a afinitě receptorů.

In vitro studie s použitím lidských tkání umožňují zhodnotit toxikologické reakce na cizorodé látky v kontrolovaných experimentálních podmínkách před vlastní expozicí člověka. Za předpokladu, že in vitro model byl potvrzen srovnáním s odpovědí in vivo, jsou in vitro studie s použitím lidských tkání přínosné pro zajištění mechanických toxikologických údajů, hodnocení relativního rizika expozice chemickým látkám a také farmakologických údajů při vývoji léků (Hawksworth, 1994).

In vitro hodnocení cytotoxicity se tedy stává stále efektivnějším ukazatelem toxického potenciálu, který je nutno řešit k maximalizování pravděpodobnosti úspěšné progresse sloučenin během vývoje. Výběr a optimalizace sloučeniny v in vitro screeningových kaskádách musí být založeny na jistotě, a to nejen co se týče účinnosti nebo biologické dostupnosti, ale také bezpečnosti (O'Brien & Haskins, 2006; Dambach et al., 2005).

4.2 Buněčné funkce hodnocené v testech cytotoxicity

K testování cytotoxicity látek je v současnosti dostupná celá řada in vitro testů. Obecně je můžeme rozdělit na testy viability (ukazatelem toxicity látky je počet živých buněk), testy cytotoxicity (indikátorem toxicity látky je počet mrtvých buněk) a na testy detekující apoptózu (ukazující na mechanismus smrti buňky) (Řeháčková, 2010). V jednotlivých testech se detekuje viabilita nebo toxicita buněk na základě měření jednoho či více indikátorů cytotoxicity, mezi něž patří například ztráta integrity membrány nebo cytolýza, apoptóza, ztráta kritických makromolekul, antimetabolické nebo antiproliferativní účinky (Xu et al., 2004).

4.2.1 Ovlivnění buněčného jádra a proliferace

Buněčná proliferace je závislá na neporušené struktuře a funkci všech životně důležitých buněčných procesů. Z toho důvodu je ovlivněna při každém toxickém působení, i když jen sekundárně. Kromě toho může terčem účinku sloučeniny být jeden z mnoha procesů specifických pro replikaci. Proliferace poskytuje celkový obrázek o cytotoxických efektech. Pozorují a zaznamenávají se charakteristické morfologické změny, které nastávají časně s buněčnou smrtí, včetně jaderné kondenzace, smršťování a fragmentace. Opačný efekt může nastat s inhibitory buněčného cyklu, které způsobují zvětšení jádra a asynchronii jádra a cytoplazmy (O'Brien & Haskins, 2006; Slaughter et al., 2002).

4.2.2 Ovlivnění buněčné membrány a transportu

Nejnámějším a nejvíce analyzovaným cytotoxickým účinkem je narušení celistvosti buněčné membrány. To způsobí eflux buněčného obsahu do extracelulárního prostoru anebo influx extracelulárních barviv, které tak označí buněčné složky. Tyto účinky jsou obvykle nespecifické a nastanou, pokud je energetická a iontová homeostáza natolik porušena, že již nemůže být zachována funkčnost membrány. Nicméně, mohou se objevit spíše v souvislosti se specifickými interakcemi například s látkami perforujícími membránu, jako jsou detergenty a inhalační anestetika, inhibitory vitálních funkcí jako iontový transport nebo signálová transdukce, a s inhibitory

specifických transportérů škodlivých látek, jaké jsou ve žlučových a renálních tubulárních buňkách. Je-li toxický účinek mírný, může se narušení buněčné membrány obejít bez známek nekrózy. Například, hromadění tuků a sacharidů v jaterní tkáni při glykogenóze a steatóze může mít za následek uvolnění buněčných enzymů bez jakýchkoliv známek nekrózy. V tomto případě jsou plazmatickou membránou vytvořeny vezikuly uzavírající cytoplazmu s enzymy a jejich odstranění probíhá bez narušení integrity membrány. V případě vážnějšího poškození dochází k uvolnění buněčného obsahu prasknutím buňky (O'Brien & Haskins, 2006; O'Brien et al., 2006; Xu et al., 2004).

4.2.3 Ovlivnění mitochondrií a energetické homeostázy

Třetím známým a nejlépe prostudovaným mechanismem cytotoxicity je pravděpodobně mitochondriální toxicita. Mitochondrie jsou všudypřítomné a sekundárně zapojené prakticky do všech buněčných funkcí. Také jsou často hlavním terčem toxicity, vzhledem k jejich složitosti a mnohým kritickým a rozmanitým rolím v oblasti energetické a vápníkové homeostázy, biosyntézy, oxidativního stresu a apoptózy. Mezi hlavní funkce mitochondrií, které mohou být ovlivněny, patří oxidativní fosforylace, β -oxidace mastných kyselin, Krebsův cyklus, mitochondriální membránový transport, mitochondriální proliferace a oxidační stres. Většina z těchto dysfunkcí se manifestuje změnou membránového potenciálu mitochondrií nebo sníženou oxidoreduktázovou aktivitou (O'Brien & Haskins, 2006; Fariss et al., 2005).

4.2.4 Reaktivní metabolity, oxidační stres a zprostředkovaná imunita

Toxicita mnohých léčiv spočívá ve vyvolání oxidačního stresu a to jedním nebo více z možných mechanismů, mezi něž patří tvorba reaktivních forem kyslíku či dusíku, vyčerpání glutationu nebo bioaktivace na elektrofilní molekuly, které tvoří adukty s buněčnými makromolekulami. Jelikož oxidační stres je běžným procesem normálně zprostředkujícím metabolickou aktivitu a detoxifikaci xenobiotik, buňky mají vyvinutou řadu složitých obranných antioxidantních systémů zahrnujících mimo jiné četné ochranné enzymy a „vychytávače“ volných radikálů. Tvorba reaktivních metabolitů je spojena

s imunitou zprostředkovaným mechanismem toxicity a postihuje kůži, krevní buňky a játra (O'Brien & Haskins, 2006; Park et al., 2005).

4.2.5 Lyzozomální funkce a autofagie

Jedním z obecně nejznámějších toxických účinků specificky spojovaných s chemickou strukturou a primárně zahrnující lysozomy, je fosfolipidóza. K tomuto ději dochází interakcí amfifilních kationických látek s fosfolipidy, takže jejich lyzozomální katabolismus je potlačen a následně dochází k jejich nadměrnému hromadění. Mezi látky vyvolávající tento efekt se řadí například antiarytmikum amiodaron, který u 10% pacientů s chronickou léčbou vyvolává vážnou pulmonální toxicitu a poškození jater.

Dalším méně obecně považovaným za primární účinek lyzozomů, který je spojený se strukturou léčiv, je zmiňována vakuolizace (Morissette et al., 2004; O'Brien & Haskins, 2006). Je to jev, při němž organické báze vstupují do acidického prostředí lyzozomu, kde získají vlivem protonizace kladný náboj znemožňující jejich zpětnou difúzi. Dochází tak k akumulaci léčiva a tím ke zvýšení intravakuolární osmotické aktivity a následný influx vody způsobí bobtnání vedoucí ke vzniku velké jasné vakuoly.

Lyzozomy jsou také sekundárně zapojeny do vztahu s jinými cytotoxickými mechanismy. Jejich účinnost a množství mohou vzrůst při apoptóze, kdy buňky podléhají programované smrti, včetně autofagie. Naopak obecně špatný zdravotní stav buňky může jejich velikost a množství snížit (O'Brien & Haskins, 2006).

4.2.6 Systém regulace vápníku

Vápník hraje nedílnou součást nejen v regulaci buněčných funkcí jako je sekrece, kontrakce, metabolismus a genová transkripce, ale také v apoptóze a buněčné smrti. Jestliže není zachován gradient ionizovaného kalcia mezi extracelulárním a intracelulárním prostorem, vede to k nefunkčnosti, aktivaci degradačních enzymů a ztrátě buňky. Kromě toho, vápník je důležitým preletálním signálem buněčného poškození z různých příčin. Porušení kalciové homeostázy může být způsobeno přímou interakcí některých léčiv nebo jejich

toxických metabolitů s vápníkem řízenými iontovými kanály a pumpami (O'Brien & Haskins, 2006; Waring, 2005).

4.3 Experimentální modely pro testování hepatotoxicity

Vzhledem k významnosti jater jako orgánu hrajícího klíčovou roli v metabolismu a toxicitě xenobiotik, představují primární kultivované hepatocyty, jaterní řezy a mikrosomy vhodné in vitro modely pro studie metabolismu léčiv (Bradlaw, 1986). Srovnání dostupných experimentálních modelů a jejich výhod a nevýhod uvádí tabulka 1 (Gómez-Lechón et al., 2010). Lidské hepatocyty jsou plně kompetentní metabolické buňky. Zachovávají si orgánově specifickou expresi enzymů a jsou schopné generovat metabolický profil léčiv podobný profilu nalezenému in vivo. Primární hepatocyty jsou tak považovány za zlatý standard modelů pro metabolismus xenobiotik a studie toxicity. Nicméně jejich užití je silně limitováno nedostatkem vhodných lidských vzorků. Navíc závažnou komplikací jejich využití v běžném testování představuje známá in vitro fenotypická nestabilita hepatocytů a vysoká funkční variabilita preparátů získaných od různých dárců (Donato et al., 2008; Posonda et al., 2001).

K překonání těchto omezení byly pro screening navrženy různé buněčné modely. Derivované lidské jaterní buněčné linie jsou vhodnými modely pro tyto účely díky některým výhodám, jimiž vynikají oproti kultivovaným lidským hepatocytům. Většinou mají neomezenou životnost, typický je pro ně neustálý růst a poměrně stálý fenotyp. Buněčné linie jsou snadno dostupné, podmínky pro kultivaci jsou jednodušší než pro primární hepatocyty a snadno standardizovatelné mezi laboratořemi. Navíc si některé hepatomy zachovávají diferencovaný dospělý fenotyp. Tyto vlastnosti činí jaterní buněčné linie potenciálně vhodnými modely pro in vitro studium hepatocelulárních funkcí, stejně jako pro testování hepatotoxicity. Pokud jde o metabolismus xenobiotik, většina buněčných linií se vyznačuje v porovnání s normálními dospělými játry velmi omezenou biotransformační aktivitou (tj. exprese pouze několika enzymů a v nízkých hladinách). Snížený stupeň aktivity se objevuje zejména pro reakce cytochromu P450 podílejících se na

oxidativním metabolismu xenobiotik. Nízká funkčnost systému P450 je pravděpodobně způsobena sníženou expresí enzymů P450. Často jsou buňkami exprimovány enzymy nehepatální (například CYP1A1 místo jaterního CYP1A2). Jaterní buněčné linie exprimují také konjugační enzymy, jmenovitě glutathion S-transferázu (GST) a UDP-glukuronyltransferázu (UGT) a sulfotransferázy. Nicméně, poměrně často nejsou produkovány izoformy enzymů shodné s těmi nalezenými v dospělé jaterní tkáni (Donato et al., 2008).

Mezi nejrozsáhleji používané jaterní buněčné linie patří HepG2. Tyto buňky vykazují mnoho specifických jaterních funkcí, expresi konjugačních enzymů, ale chybí funkční exprese téměř všech relevantních lidských jaterních P450. V důsledku toho, představují velmi chudou alternativu primárních kultivovaných buněk. Aktivita a obsah bílkovin většiny enzymů P450 nejsou detekovatelné konvenčními metodami a pouze velmi citlivé techniky odhalí a kvantifikují stupeň transkripce genů. Většina izoform P450 (tj. CYP2B6, 2C9, 3A4) studovaných v HepG2 prezentuje hodnoty o 2-3 řády nižšího rozsahu než v hepatocytech (Donato et al., 2008).

HepaRG buňky představují novou linii hepatomálních buněk odvozenou z lidského hepatocelulárního karcinomu. Vykazují vlastnosti plně diferencovaného hepatocytu. Pokud se nasadí v nízké hustotě, získají se protáhlé morfologicky nediferencované buňky, aktivně se dělicí a po dosažení spojení vytvoří hepatocytům podobné kolonie obklopené buňkami podobnými žlučovým epiteliálním buňkám. Navíc, na rozdíl od jiných jaterních buněčných linií (včetně HepG2), HepaRG buňky exprimují nejen různé P450 (CYP1A2, 2B6, 2C9, 2E1, 3A4), ale také nukleární receptory CAR a pregnanový receptor (PXR) ve srovnatelných hladinách jako u kultivovaných primárních jaterních hepatocytů. Tyto buňky jsou schopny odpovídat také na selektivní induktory enzymů cytochromu P450. HepaRG buňky by tak mohly představovat náhradu primárních lidských hepatocytů pro metabolismus xenobiotik a toxicitní studie (Donato et al., 2008; Aninat et al., 2006).

Farmaceutické společnosti stále více využívají buněčné linie k urychlení selekce nových léčiv. Navíc, vzhledem k omezené expresi metabolizačních enzymů u většiny jaterních buněčných linií, jsou dále

zkoumány alternativní přístupy pro získání nesmrtelných hepatocytů nekarcinomového původu. Úspěšné immortalizace normálních hepatocytů bylo dosaženo za použití různých strategií zahrnujících buněčnou transformaci virovými geny či onkogeny, vytvoření buněčných linií z transgenních zvířat exprimujících virové transformační geny, onkogeny nebo růstové faktory, nebo získání hybridních buněk fúzí hepatocytů a immortalizovaných buněčných linií (Donato et al., 2008).

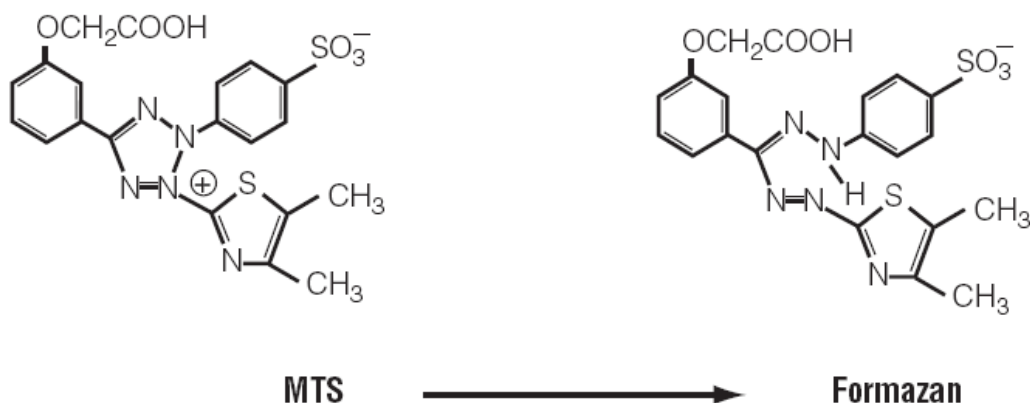
Tabulka 1. In vitro modely pro studie hepatotoxicity (upraveno dle Gómez-Lechón et al., 2010)

In vitro model	Výhody	Limitace
Jaterní řezy	<ul style="list-style-type: none"> - zachována struktura a enzymy - buněčná heterogenita (včetně neparenchymálních buněk) - možnost histologického vyšetření - funkční hodnocení (enzymy, transportéry) - zachována bipolarita hepatocytů 	<ul style="list-style-type: none"> - omezená životnost a funkce - omezená dostupnost (čerstvá lidská játra) - vysoká variabilita mezi stanoveními - technická náročnost - bez možnosti kryoprezervace
Izolované hepatocyty	<ul style="list-style-type: none"> - snadná dostupnost (možnost kryoprezervace) - snadná manipulace (přiměřeně vysoká kapacita) - studie životnosti a funkcí (enzymy, transportéry) - mezidruhové studie 	<ul style="list-style-type: none"> - nízká životnost (2-4 h) - není mezibuněčný kontakt a interakce mezi buňkou a matrix - změny ve fenotypu vyvolané narušením tkáně - vysoká variabilita (kvalita přípravy)
Primární kultivované hepatocyty	<ul style="list-style-type: none"> - snadné použití - studie životnosti a funkcí - potenciální využití pro dlouhodobé studie - detekce metabolismem zprostředkované hepatotoxicity 	<ul style="list-style-type: none"> - omezená dostupnost (lidská tkáň) - časné změny ve fenotypu - ztráta schopnosti metabolismu léčiv

	<ul style="list-style-type: none"> - přiměřená podobnost k in vivo jaternímu fenotypu - možnost 3-D kultur (transportní studie) - co-kultury s jinými jaterními buňkami - podobnost k morfologii in vivo - mezibuněčný kontakt a interakce mezi buňkou a matrix (dle kultivačních podmínek) - mezidruhové studie 	<ul style="list-style-type: none"> - potřeba zlepšení kryoprezervace - variabilita mezi dárci (lidská játra) - vysoký vliv kultivačních podmínek (přežití, funkce)
Odvozené jaterní buněčné linie	<ul style="list-style-type: none"> - neomezená životnost - snadné použití - možnost genetické manipulace (jediný enzym / transportní studie) - vysoká reprodukovatelnost 	<ul style="list-style-type: none"> - chybění / nízká exprese klíčových jaterních funkcí - omezený / částečný metabolismus léčiv - není reprodukce in vivo jaterního fenotypu
Subcelulární frakce (S-9, mikrosomy, mitochondrie)	<ul style="list-style-type: none"> - snadná dostupnost - studie dysfunkce mitochondrií /energetického metabolismu - studie kovalentní vazby 	<ul style="list-style-type: none"> - omezené použití ve studiích toxicity - nejsou zachovány buněčné struktury a funkce - extrapolace na buňky in vivo?

4.4 Principy použité metody stanovení cytotoxicity

Použitá metoda se řadí mezi stanovení založená na metabolickém stavu buňky. Konkrétně byl použit test spočívající ve stanovení redukční kapacity buňky s využitím tetrazolových barviv. Jedná se o kolorimetrickou metodu, jejímž činidlem je sloučenina typu tetrazolinu MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium] ve formě inertní soli a PES (fenazin ethosulfát). PES zvyšuje chemickou stabilitu, což umožňuje kombinace těchto dvou látek (MTS a PES) ve formě stabilního roztoku. Tetrazolová sloučenina MTS je uvnitř buňky redukována na barevný produkt formazan, který je rozpustný v buněčném médiu (obr. 1). Tato přeměna MTS na formazan je patrně uskutečněna prostřednictvím NADPH nebo NADH dehydrogenáz metabolicky aktivní buňky. Množství barevného formazanu je přímo úměrné počtu živých buněk. Pokud klesá metabolická aktivita buňky v důsledku jejího poškození, snižuje se tak schopnost buňky redukovat MTS, a tím tvorba formazanu. Tento pokles množství formazanu v buňce se projeví snížením hodnot jeho absorpance a odpovídá tak poklesu viability buněk. Absorbance formazanu se měří při 490 nm (Řeháčková, 2010; Anonym, 2009).



Obr. 1. Redukce tetrazoliové soli MTS na formazan metabolicky aktivní buňkou (Řeháčková, 2010)

Reagens MTS je fotosenzitivní. Pokud je činidlo vystaveno několik hodin světlu, může dojít ke změně jeho barvy, což může způsobit mírné zvýšení pozadí absorbance. Na vykonání testu by to ovšem nemělo mít velký vliv.

Zvýšené pozadí absorbance může být následkem interakce mezi tetrazolovou sloučeninou MTS a testovanou látkou. Např. kyselina askorbová, glutathion, koenzym A jsou schopny redukovat tetrazoliovou sůl MTS na formazan a tím způsobují zvýšené pozadí absorbance. Specifické chemické interakce testovaných látek lze potvrdit měřením absorbance kontrol testovaných látek s činidlem bez buněk. V malé míře může být spontánní neenzymatická redukce tetrazoliové soli způsobena buněčným médiem při inkubaci s činidlem v závislosti na pH buněčného média, na typu séra a době expozice světlem. Zvýšené pH buněčného média nebo delší vystavení přímému světlu může spontánnost reakce urychlit. Zvýšené pozadí lze korigovat pomocí naměřených hodnot absorbance kontrol buněčného média bez buněk.

Doporučená doba inkubace s činidlem je 1-4 hod., po které následuje změření absorbance při 490 nm. V případě, že potřebujeme změřit absorbanci později, lze probíhající reakci zastavit 10 % SDS. Destičky s SDS chráněné před světlem je možné skladovat až 18 h při pokojové teplotě (Řeháčková, 2010).

4.5 Testované látky

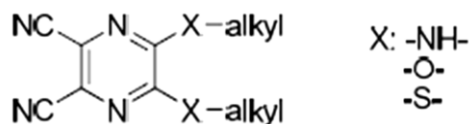
4.5.1 Deriváty 5,6-substituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů

Deriváty 5,6-substituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů (obr. 2) jsou používány jako prekurzory pro přípravu pyrazinoporfyrasinů. Ale současně jsou deriváty pyrazinu intenzivně studovány pro jejich antiinfekční (antibakteriální, antifungální a antituberkulotické) účinky.

Tyto deriváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilu byly dosud testovány na in vitro aktivitu vůči 8 kmenům hub a mykobakteriím. Provedené testy ukázaly vztah mezi strukturou a in vitro aktivitou, kde byly účinné pouze alkylaminoderiváty, a to jen na G+ bakterie a mykobakterie. Některé alkyloxyderiváty a alkylsulfanylderiváty vykázaly aktivitu pouze proti mykobakteriím. Inhibiční aktivity testovaných sloučenin byly porovnány s inhibičními aktivitami používaných antiinfekčních látek (Kopecký et al., 2010).

Skupina všech čtyř testovaných látek byla dodána z Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

Testované vzorky s označením ZIP-34, ZIP-128, ZIP-130 a ZIP-136 se vyznačují špatnou rozpustností ve vodě a dobrou v DMSO a navzájem podobnou molekulovou hmotností pohybující se v rozmezí hodnot 270 až 350. Přesná chemická struktura těchto látek je zatím nevěřejná z důvodu probíhajícího patentového řízení.



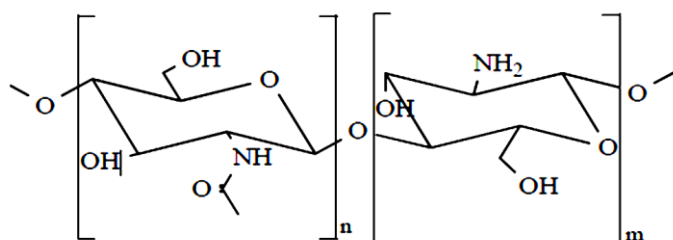
Obr. 2. Obecná struktura testovaných sloučenin (Kopecký et al., 2010)

4.5.2 Látky ze skupiny chitosanů

Chitosan je známý jako biologicky aktivní, biokompatibilní, biodegradabilní polymer s nízkou toxicitou a mnohými zajímavými vlastnostmi. Mezi ně patří

například antimikrobiální, antioxidační, antikoagulační a mukoadhezivní aktivita. Jedná se o přírodní lineární polysacharid odvozený od chitinu, po celulóze druhého nejrozšířenějšího polysacharidu vyskytujícího se mimo jiné v řadě tělních schránek bezobratlých (vnější kostra, krusty, kutikula) a buněčné stěně hub. Pro své výjimečné vlastnosti je chitosan rozsáhle využíván v oblasti farmacie, kosmetiky, biomedicíny, potravinářství, zemědělství a biotechnologie (Vavříková et al., 2011; Aranaz et al., 2010; Zeng et al., 2008).

Chemická struktura chitosanu je složena z variabilního množství D-glukosaminových a N-acetyl-D-glukosaminových jednotek spojených β -1,4-glykosidickou vazbou (obr. 3). U komerčně připravovaného chitosanu dosahuje stupeň acetylace obvykle rozmezí 60 až 100% a má vliv na rozpustnost, index bobtnání, hojení ran a antimikrobiální vlastnosti. Lze ho použít jako polymerní léčivo s vlastní farmakologickou aktivitou, ačkoliv samotná monomerní jednotka je biologicky neaktivní. Předně se ale využívá jako nosič léčiva pro různé systémy podávání léčiv se širokou škálou terapeutických aplikací (Vavříková et al., 2011).



Obr. 3. Chemická struktura chitosanu (Aranaz et al., 2010)

Jedna molekula chitosanu má tři reaktivní centra: primární aminoskupinu a primární a sekundární hydroxylovou skupinu (Vinšová & Vavříková, 2008). Chemickou modifikací lze zlepšit rozpustnost chitosanu ve vodě a usnadnit navazování léčiv. Pro zavedení karboxylové skupiny je velmi vhodná O-karboxymetylace nebo N-sukcinylace. Rozpustnost O-karboxymetylovaného chitosanu (OCMC) závisí na reakčních podmínkách karboxymetylace, zvláště na teplotě a na poměru vody a propan-2-olu použitých jako reakčního rozpouštědla (Vavříková et al., 2011). N-

sukcinylovaný chitosan (NSCS) je dobře známý jako nosič léčiva s dlouhodobou cirkulací v těle. Přední využití N-sukcinylovaného chitosanu spočívá v terapii nádorů (Kato et al., 2000; Kato et al., 2004).

Užití proléčiv vytvořených navázáním terapeuticky účinné molekuly biodegradabilní vazbou na modifikovaný polymer (např. NSCS či OCMC) se zaměřuje na a) zlepšení pohybu léčiva v těle změnou rozpustnosti a velikosti molekuly, b) udržení odpovídající koncentrace prostřednictvím pomalého uvolňování léku, c) místně specifický transport k cílovým buňkám, d) podporu inkorporace léčiva do buněk prostřednictvím endocytózy, e) hybridizaci nebo synergismus dvou typů léčiv nebo léčiva s bioaktivním polymerním nosičem. Struktura makromolekulárních konjugátů léčiva musí být v souladu s fyzikálními vlastnostmi konjugátu a biochemickými vlastnostmi polymerního nosiče. Makromolekulární nosiče díky jejich velikosti, elektrickému náboji, hydrofilně-lipofilní bilanci a specifické transmembránové kapacitě mohou změnit farmakologickou a imunologickou aktivitu léčiv a jejich dostupnost (Vinšová & Vavříková, 2008).

Chi-2-SP a Chi-7

Obě testované látky byly dodány z Katedry organické a anorganické chemie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

Tyto látky jsou makromolekulárními konjugáty chitosanu s antituberkuloticky účinnými sloučeninami. Konkrétně se jedná o izoniazid a pyrazinamid, které jsou v současnosti používány v terapii tuberkulózy a vykazují potenciálně hepatotoxický efekt. K jejich metabolizaci a detoxifikaci dochází v játrech a vzniklé toxické metabolity působí léky indukovanou hepatotoxicitu. Hepatotoxicita může být smrtelná, jestliže není rozpoznána v časně fázi, v níž by měla být terapie přerušena. Rozvoj léky navozené hepatotoxicity závisí na hlavních rizikových faktorech, jako jsou věk, pohlaví, etnická skupina, acetylační fenotyp a HIV infekce (Sharma, 2004). Hydrazin, metabolit izoniazidu způsobuje signifikantní tvorbu endogenního peroxidu iniciujícího proces tvorby volných radikálů, což vede k poškození lyzozomů a rozvoji zánětu. Při použití kombinace léčiv může dojít k synergii hepatotoxických

účinků (Tostmann et al., 2004; Yue et al., 2009). Současné podání chitosanu s antituberkulotikem, testované u potkanů, mělo tendenci zabránit vzniku indukované hepatotoxicity. Hepatoprotektivní účinek chitosanu spočívá pravděpodobně v jeho působení proti volným radikálům vlastní antioxidační aktivitou a/nebo ve schopnosti inhibovat akumulaci lipidů díky jeho antilipidemickým vlastnostem (Santhosh et al., 2007; Vavříková et al., 2011).

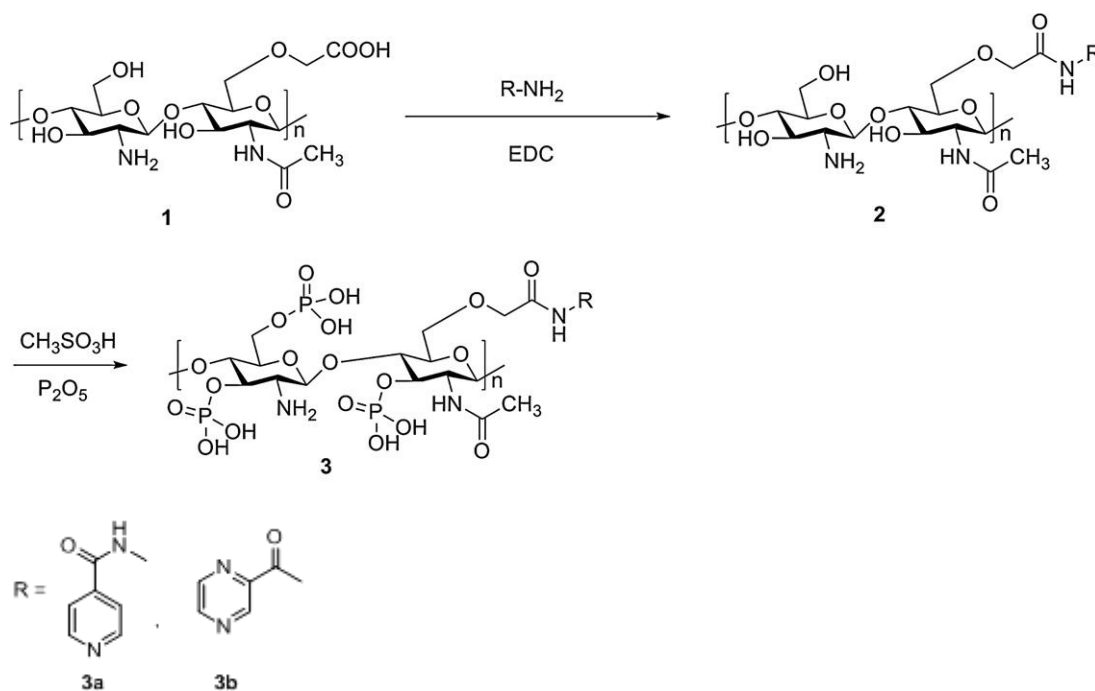
Chi-2-SP

Ve vodě rozpustný konjugát chitosanu připravený napojením izoniazidu přes O-karboxymetylový můstek s následnou fosforylací (obr. 4 (3a)). Zjištěná molekulová hmotnost Chi-2-SP je 14394 Da a stupeň substituce činí 0,89%.

Chi-7

Ve vodě rozpustný konjugát chitosanu připravený napojením pyrazinamidu přes O-karboxymetylový můstek s následnou fosforylací (obr. 4 (3b)). Zjištěná molekulová hmotnost Chi-7 je 12600 Da a stupeň substituce činí 1,32%.

Stupeň deacetylace samotných chitosanů použitých pro tvorbu konjugátů odpovídal 20% (Vavříková et al., 2011).



Obr. 4. Schéma konjugace OCMC a antituberkulotického léčiva; (1) OCMC, (2) konjugát OCMC s léčivem, (3) fosforylovaný konjugát s (3a) izoniazidem a (3b) pyrazinamidem (Vavříková et al., 2011).

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Materiál

5.1.1 Použitý buněčný model

- Měření buněčné toxicity testovaných látek bylo provedeno na buněčné linii lidských jaterních buňek HepG2 (pasáž 24-28) (Health Protection Agency Culture Collections - ECACC, Salisbury, UK)

5.1.2 Přístroje a zařízení

- Laminární box: Micrological safety cabinet TOP – SAVE 1,8 (Bioair instruments s.r.l., Itálie)
- Inkubátor (Shel Lab, USA, dodavatel Biotech, Praha)
- Destičkový analyzátor (TECAN, Infinite M200, Rakousko)
- Laboratorní třepačka KS – 15 Control, Buhler, s inkubačním nástavcem TH 15 (Johanna Otto GmbH, Hechigen, SRN)
- Váhy Kern & Sohn GmbH (Kern & Sohn GmbH, SRN)
- Vodní lázeň, TW 12 water bath (Julabo, SRN)
- Mikroskop OPTIKA Mircoscopes, XDS-1R (OPTIKA Mircoscopes, Itálie)

5.1.3 Další použitý materiál

- Automatické pipety Discovery autoclavable (100 - 1000 μ l, 10 - 100 μ l, 5 - 50 μ l) (Hight tech lab, Polsko)
- Sterilní, nepyrogní skleněné pipety (25 ml, 10 ml, 5 ml) (TPP, Švýcarsko)
- Pipetník SWIFTPET (HTL, Polsko)
- 96-ti jamkové mikrotitrační destičky (NUNC, dodavatel Schoeller, Praha)
- Kultivační lahve 75 cm² (TPP, dodavatel Biotech, Praha)

Použitý kit

- CellTiter 96(R) AQueous One Solution Assay (Promega G3580, dodavatel East Port, Praha)

5.1.4 Chemikálie

- Kultivační médium pro jaterní buňky HepG2:
Minimum Essentials Eagle Medium (Sigma-Aldrich), s 1% glutaminu (SIGMA-ALDRICH), 10% fetálního séra (PAA, dodavatel Biotech, Praha) a 1% neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich)
- DMSO (dimethyl sulfoxide for molecular biology >99,9%) (Sigma-Aldrich)
- Trypsin (0,25% , Trypsin-EDTA Solution) (Sigma-Aldrich)
- Fosfátový pufr (PBS-phosphate buffered saline; pH=7,4) (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄)

5.1.5 Testované látky

5,6-substituované deriváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

Látky byly dodány z Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutické fakulty v HK, Univerzity Karlovy v Praze.

- ZIP-34
- ZIP-128
- ZIP-130
- ZIP-136

Deriváty chitosanu

Látky byly dodány z Katedry anorganické a organické chemie, Farmaceutické fakulty v HK, Univerzity Karlovy v Praze.

- Chi-2-SP (O-karboxymetylovaný chitosan spojený s izoniazidem)
- Chi-7 (O-karboxymetylovaný chitosan spojený s pyrazinamidem)

5.2 Metoda

Stanovení cytotoxicity pomocí metody CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay.

Za použití metody CellTiter 96 jsme na zvolené buněčné linii lidských jaterních buněk HepG2 (pasáž 23-26) testovali cytotoxicity látek ze dvou skupin xenobiotik, každou v širokém rozmezí koncentrací. Jednalo se o koncentrace zvolené tak, aby bylo možné stanovit účinné koncentrace a příslušné toxikologické parametry. Vodítkem byly mikrobiologicky účinné koncentrace pro jednotlivé látky odvozené z výsledků, které poskytla Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutické fakulty v HK, Univerzity Karlovy v Praze.

Postup:

1. Nasazení buněk na testovací destičku

Nejdříve jsme zpasážovali adherentní buňky. Po odsátí původního media, opláchnutí roztokem PBS a přidání trypsinu jsme pod mikroskopem zkontrolovali, zda došlo k rozvolnění shluků buněk a oddělení ode dna pasážovací misky. Následně jsme přidali buněčné medium, abychom inhibovali funkci přítomného trypsinu. Pomocí Bürkerovy komůrky jsme spočítali buňky a naředili je buněčným médiem, tak aby výsledné koncentrace byly 10 000 buněk/100μl pro testování derivátů pyrazin-2,3-dikarbonitrilu a 10 000 buněk/50μl pro deriváty chitosanů. Tyto koncentrace se na základě výsledků pokusů jevíly pro experiment jako nejvhodnější. Do 96-ti jamkové mikrotitrační destičky jsme pipetovali suspenzi buněk v množství 100μl, příp. 50μl/jamku dle testované látky. Buňky jsme nechali po dobu 4-5h inkubovat při 37°C a 5 % CO₂ v inkubátoru.

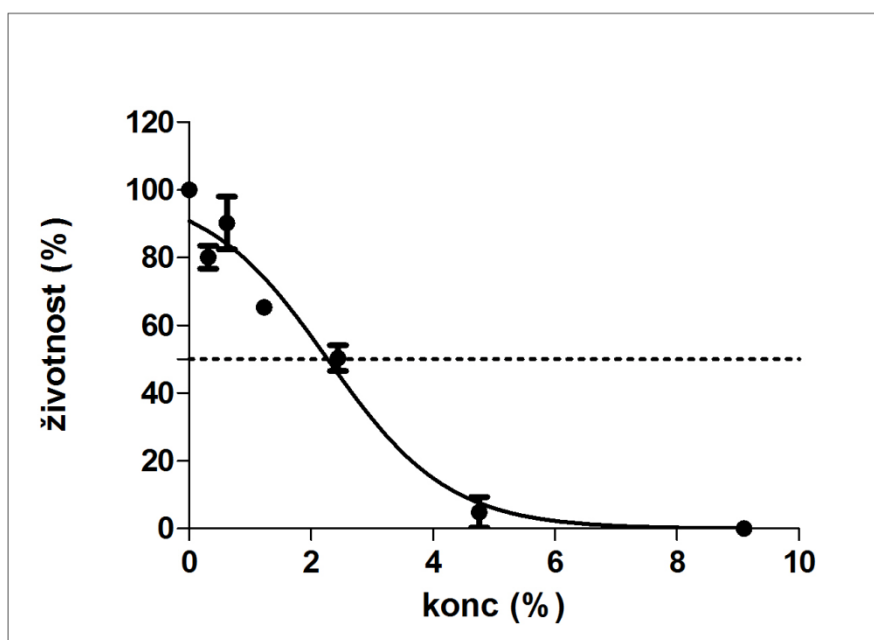
2. Příprava roztoků testovaných látek

Testované vzorky ze skupiny ZIPů se vyznačují špatnou rozpustností ve vodě, proto byl pro přípravu roztoků použit DMSO. Tato látka je již v relativně nízkých koncentracích pro buňky toxická. Pro zjištění optimálního množství přidaného DMSO jsme provedli experiment, kdy jsme k buněčné suspenzi

přidali DMSO v 6 různých inkubačních koncentracích. Na základě výsledků tohoto pokusu uvedených v tabulce 2 a na obrázku 5, jsme připravili zásobní roztoky testovaných ZIPů tak, aby výsledná koncentrace DMSO po přidání vzorků k buněčné suspenzi byla nejvýše 1 %. Každou látku jsme testovali v 6 až 12 různých koncentracích, které jsme upravovali na základě výsledků testů. Rozmezí inkubačních koncentrací testovaných látek je uvedeno v tabulce 3. Roztoky derivátů chitosanů jsme připravili rozpuštěním jednotlivých navážek v buněčném médiu bez séra. Zásobní koncentrace nachystaných roztoků byla, jak ukazuje tabulka 4, dvakrát vyšší než potřebná koncentrace inkubační, neboť po přidání do testovací destičky se koncentrace připravených roztoků naředila buněčným médiem s buňkami právě dvakrát.

Tabulka 2. Působení DMSO na HEP-G2 buňky

DMSO (μl)	inkubační konc. (%)	životnost (%)
0,312	0,31	80,12
0,625	0,62	90,21
1,25	1,23	65,38
2,5	2,44	50,35
5	4,76	4,81
10	9,10	0



Obrázek 5. Působení DMSO na HepG2 buňky

Tabulka 3. Rozmezí inkubačních koncentrací testovaných ZIPů

látka	Mr (g/mol)	testované rozmezí inkubačních koncentrací (μM)
ZIP-34	272,36	0,125 – 8
ZIP-128	356,52	0,1 - 100
ZIP-130	328,46	0,125 - 32
ZIP-136	300,41	0,125 - 80

Tabulka 4. Příprava roztoků derivátů chitosanů o různých koncentracích

Chi-2-SP		Chi-7	
Zásobní konc. (mg/ml)	Inkubační konc. (mg/ml)	Zásobní konc. (mg/ml)	Inkubační konc. (mg/ml)
1	0,5	1	0,5
2	1	2	1
3	1,5	3	1,5
4	2	4	2
5	2,5	5	2,5
6	3	6	3

K buňkám jsme do jamek mikrotitrační destičky pipetovali všechny vzorky v triplicátech pro každou koncentraci. Ke koncentraci buněk 10 000/50 μl jsme přidávali 50 μl roztoků testovaných látek a ke koncentraci 10 000 buněk/100 μl takové množství roztoků, aby byla splněna výše uvedená podmínka obsahu DMSO.

Současně jsme připravili kontroly testovaných látek s buněčným médiem bez buněk pro všechny koncentrace. Další z provedených kontrol byly kontrola pro stanovení 100% životnosti, kontrola pro stanovení nulové životnosti (100% toxicita působením 10% DMSO) a kontrola pozadí inkubačního média a DMSO. Všechny kontroly byly opět připraveny v triplicátech.

3. Inkubace buněk s testovanými látkami

Připravené vzorky s testovanými sloučeninami a kontrolní vzorky byly inkubovány po dobu 24 h při 37°C v atmosféře s 5 % CO_2 .

4. Přidání reakčního činidla

Po uplynutí inkubační doby jsme do jamek s buňkami a testovanou látkou přidali 20 μ l reagens z použitého kitu. Množství bylo zvoleno dle doporučeného poměru objemu činidla k objemu buněčného média 1:5. Následovala inkubace vzorků s reakčním činidlem při 37°C v atmosféře s 5 % CO₂ po dobu 2 h.

5. Odečtení hodnot absorbance

Pomocí destičkového analyzátoru byly naměřeny hodnoty absorbance při vlnové délce 490 nm.

5.2.1 Vyhodnocení naměřených dat

Odečtené výsledky jsme statisticky zpracovali v programech Microsoft Excel 2007 a GraphPad Prism 5.02.

V programu Microsoft Excel jsme zprůměrovali naměřené hodnoty absorbance triplikátů testované látky a vypočítali směrodatnou odchylku těchto hodnot. Po vypočtení průměrů triplikátů také u kontrol testované látky (s médiem bez buněk) jsme tuto hodnotu odečetli od stanoveného průměru absorbance testované látky. Výslednou hodnotu jsme snížili o zprůměrované hodnoty kontroly pro nulovou životnost a od výsledku ještě odečetli kontroly pro 100% životnost sníženou o hodnotu kontroly pro nulovou životnost.

Zpracované výsledky jsme použili v programu GraphPad Prism 5.02 k vytvoření grafů závislosti životnosti buněk na stoupající koncentraci testovaných látek a ke stanovení jejich IC₅₀ s využitím metody nelineární regrese.

5.2.2 Mikroskopické zobrazení cytotoxického účinku

Pro ověření cytotoxického účinku byly vybrané preparáty buněk po inkubaci s testovanou látkou podrobeny mikroskopickému vyšetření pomocí světelné mikroskopie. Hodnocení morfologického stavu buněčného preparátu bylo provedeno u látky ZIP-34 a byly fotograficky zdokumentovány změny v závislosti na zvyšující se inkubační koncentraci látky. Fotografická

dokumentace byla prováděna za spolupráce s Mgr. J. Mandíkovou, Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, UK.

5.3 Výsledky

5.3.1 Stanovení cytotoxicity derivátů substituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů

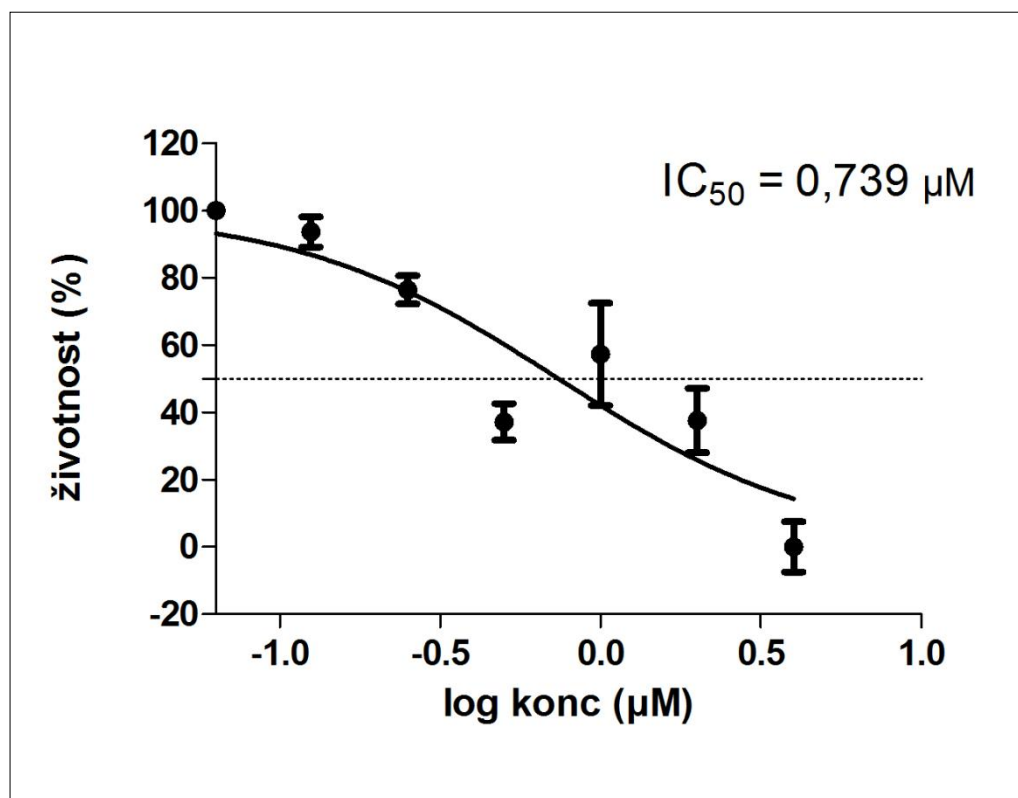
Tabulky 5-8 uvádějí životnosti buněk HepG2 zjištěné po 24 hod inkubace s vybranými koncentracemi látek ZIP-34, ZIP-128, ZIP-130 a ZIP-136, které byly nalezeny s použitím metody CellTiter 96. Obrázky 6-9 vyjadřují závislost životnosti buněk v % na koncentraci testované látky v μM v semilogaritmickém vyjádření.

Tabulka 9 a obr. 10 uvádějí porovnání cytotoxického účinku testovaných látek na jaterní lidské buňky HepG2 s využitím metody CellTiter 96. Pro vyjádření toxicity byl použit standardní parametr IC_{50} odečtený ze závislostních grafů. Nejvyšší toxicitu z testovaných látek vykazoval ZIP-128 a nejméně toxicky působil ZIP-136.

Změny potvrzující cytotoxické účinky nalezené při mikroskopickém vyšetření preparátů buněk po 24 hod působení vybrané testované látky ZIP-34 jsou dokumentovány na obrázcích 11-13.

Tabulka 5. Životnost buněk vzhledem ke koncentraci testované látky ZIP-34

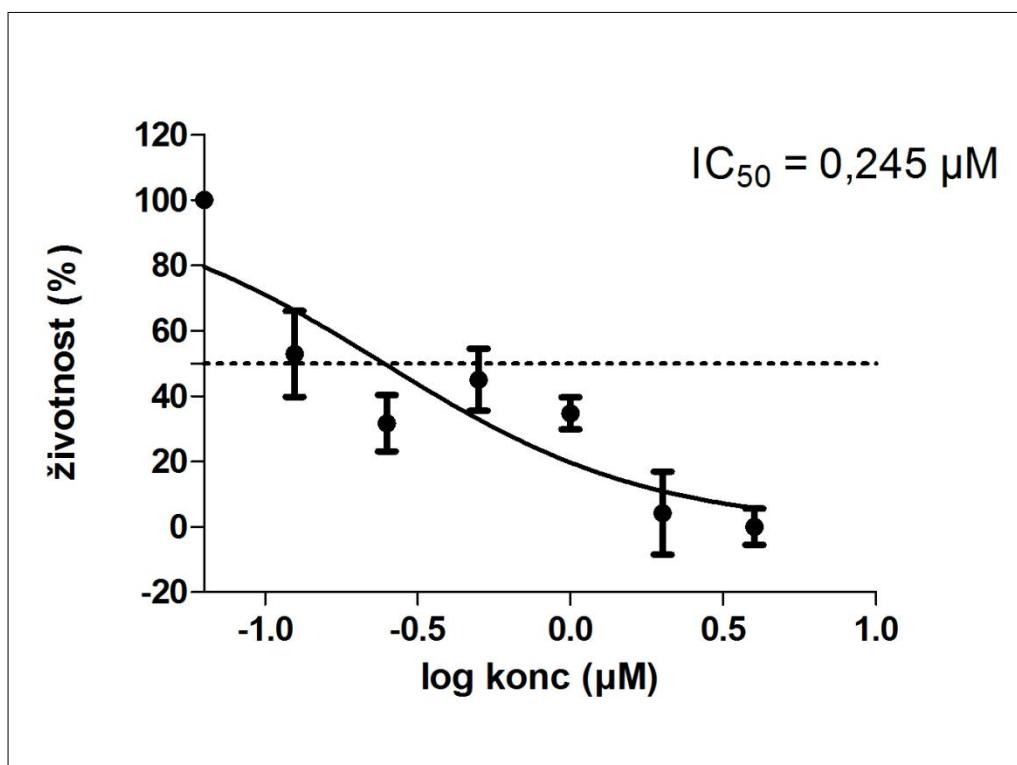
ZIP-34		
Koncentrace (μM)	Log konc. (μM)	Životnost (%)
0,125	-0,9	93,7
0,250	-0,6	76,4
0,5	-0,3	37,2
1	0	57,2
2	0,3	37,6
4	0,6	-12,4



Obr. 6. Závislost životnosti buněk na koncentraci testované látky ZIP-34

Tabulka 6. Životnost buněk vzhledem ke koncentraci testované látky ZIP-128

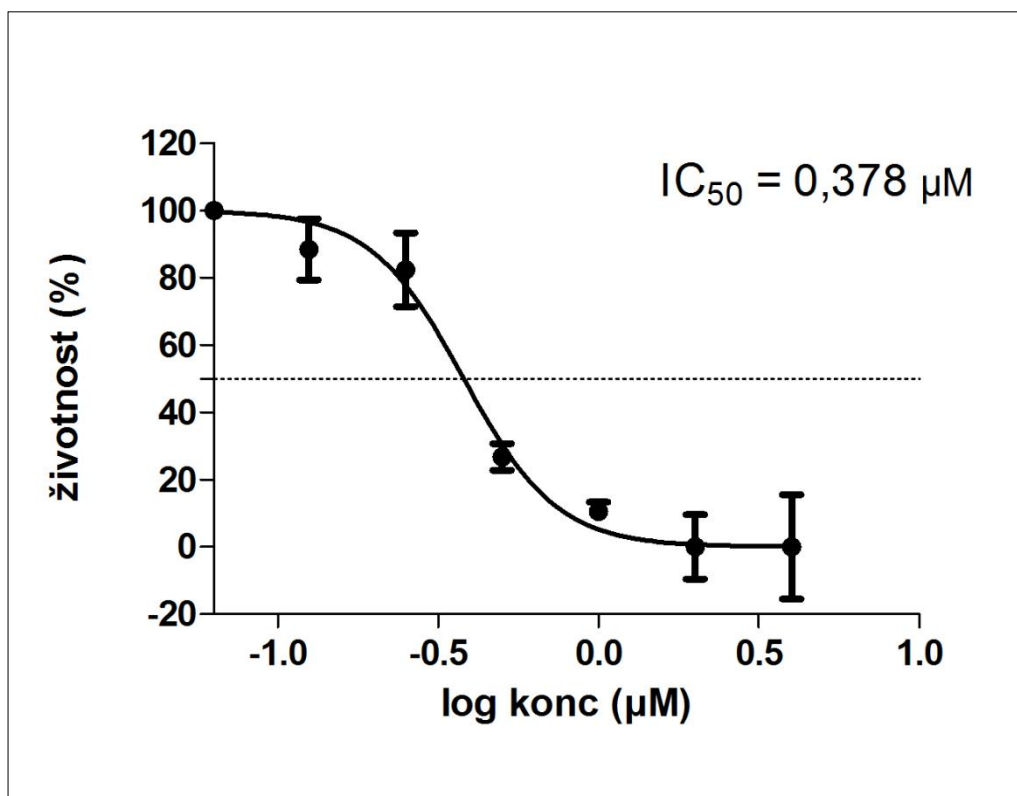
ZIP-128		
Koncentrace (μM)	Log konc. (μM)	Životnost (%)
0,125	-0,9	52,9
0,250	-0,6	31,7
0,5	-0,3	45,1
1	0	34,7
2	0,3	4,2
4	0,6	-10,1



Obr. 7. Závislost životnosti buněk na koncentraci testované látky ZIP-128

Tabulka 7. Životnost buněk vzhledem ke koncentraci testované látky ZIP-130

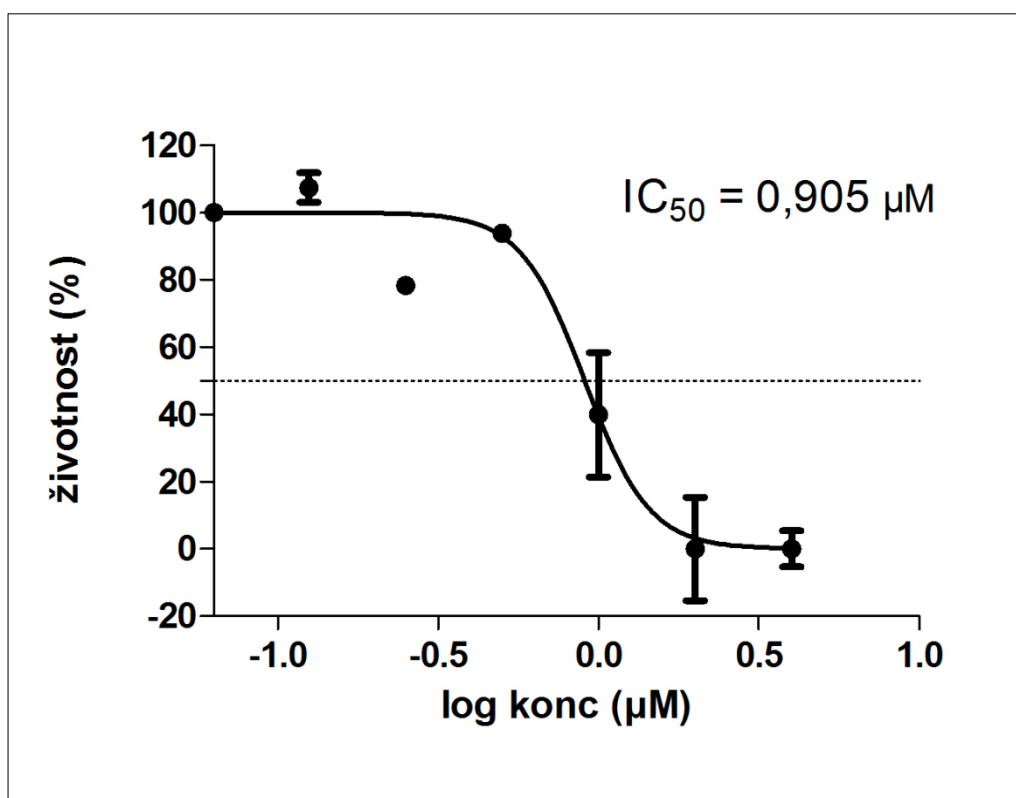
ZIP-130		
Koncentrace (μM)	Log konc. (μM)	Životnost (%)
0,125	-0,9	88,4
0,250	-0,6	82,4
0,5	-0,3	35,7
1	0	10,6
2	0,3	-7,2
4	0,6	-14,0



Obr. 8. Závislost životnosti buněk na koncentraci testované látky ZIP-130

Tabulka 8. Životnost buněk vzhledem ke koncentraci testované látky ZIP-136

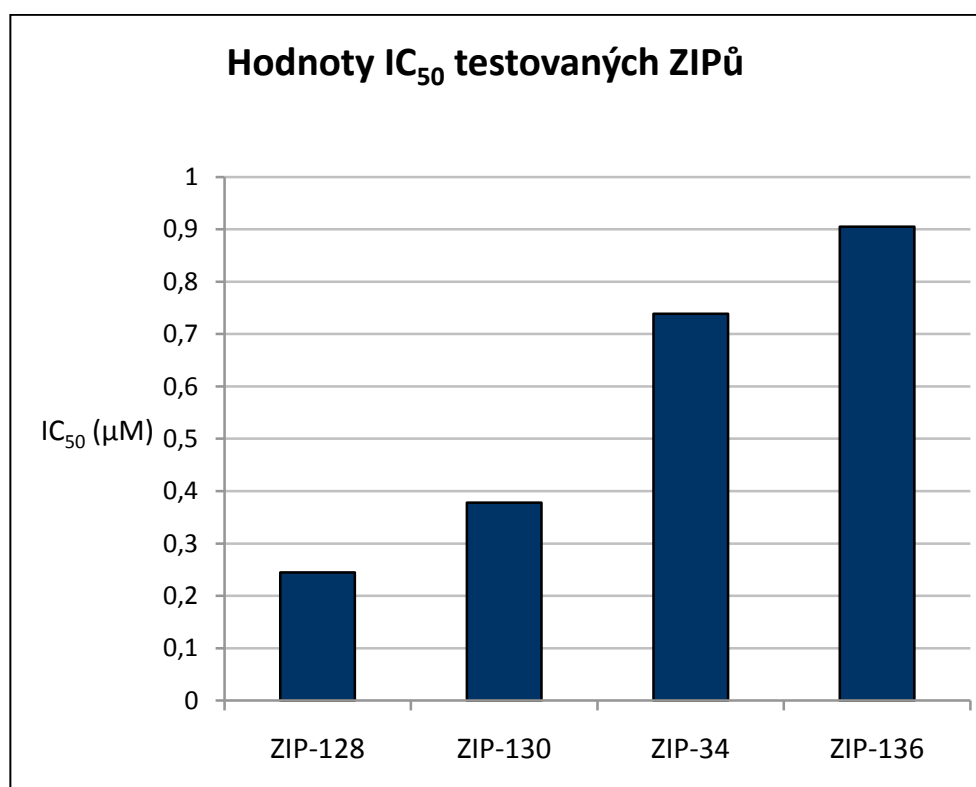
ZIP-136		
Koncentrace (μM)	Log konc. (μM)	Životnost (%)
0,125	-0,9	107,4
0,250	-0,6	78,3
0,5	-0,3	93,8
1	0	39,9
2	0,3	-2,5
4	0,6	-17,2



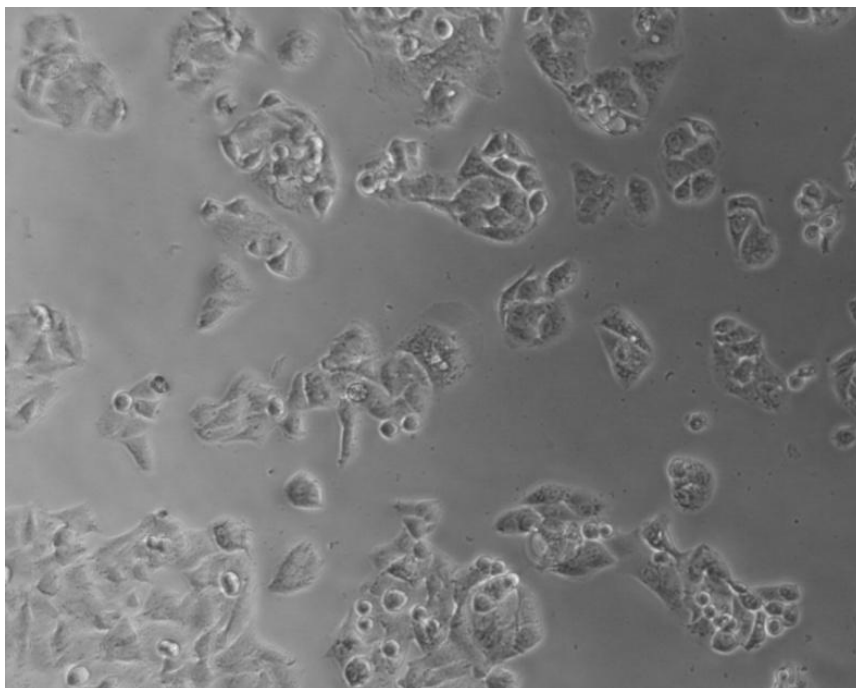
Obr. 9. Závislost životnosti buněk na koncentraci testované látky ZIP-136

Tabulka 9. Hodnoty IC_{50} testovaných látek ze skupiny ZIPů u HepG2 buněk

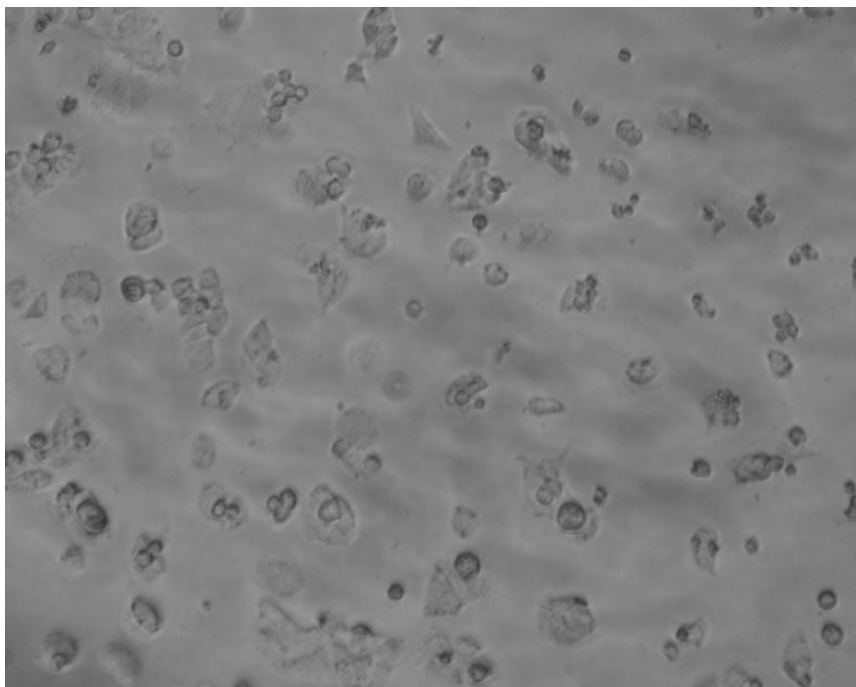
Testovaná látka	IC_{50} (μM)
ZIP-34	0,739
ZIP-128	0,245
ZIP-130	0,378
ZIP-136	0,905



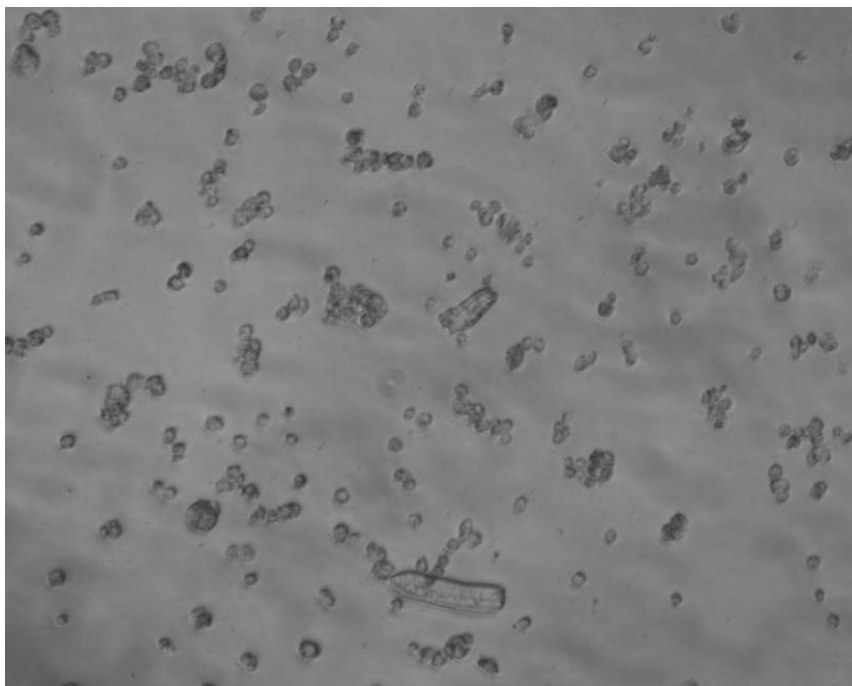
Obr. 10. Porovnání hodnot IC_{50} testovaných látek ze skupiny ZIPů u HepG2 buněk



Obr. 11. Mikroskopický obraz preparátu HepG2 buněk po 24 hod inkubace v 0,125 μM roztoku ZIP-34



Obr. 12. Mikroskopický obraz preparátu HepG2 buněk po 24 hod inkubace v 0,5 μM roztoku ZIP-34



Obr. 13. Mikroskopický obraz preparátu HepG2 buněk po 24 hod inkubace v 4 μ M roztoku ZIP-34

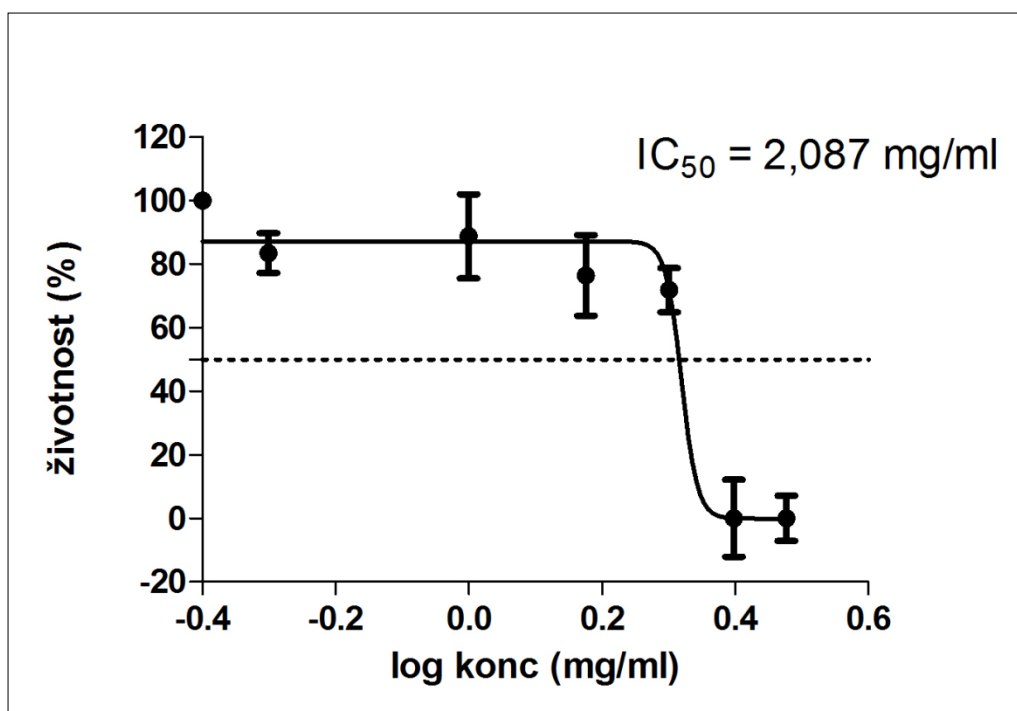
5.3.2 Stanovení cytotoxicity derivátů chitosanů

Tabulky 10 a 11 uvádějí zjištěné životnosti buněk HepG2 po 24 hod inkubace s vybranými koncentracemi látek Chi-2-SP a Chi-7 nalezené s použitím metody CellTiter96. Pro vyjádření toxicity byly opět použity hodnoty IC_{50} odečtené ze závislostních grafů vytvořených pomocí programu GraphPad Prism 5.02. U látky Chi-7 se tento základní cytotoxický parametr nepodařilo stanovit a jedná se tedy o odhad, neboť průběh toxicitní křivky nedovoloval validní výpočet IC_{50} .

V tabulce 12 jsou porovnány výsledné hodnoty IC_{50} testovaných chitosanů. Obrázky 14 a 15 vyjadřují závislost životnosti buněk v % na koncentraci testované látky v mg/ml v semilogaritmickém vyjádření.

Tabulka 10. Životnost buněk vzhledem ke koncentraci testované látky Chi-2-SP

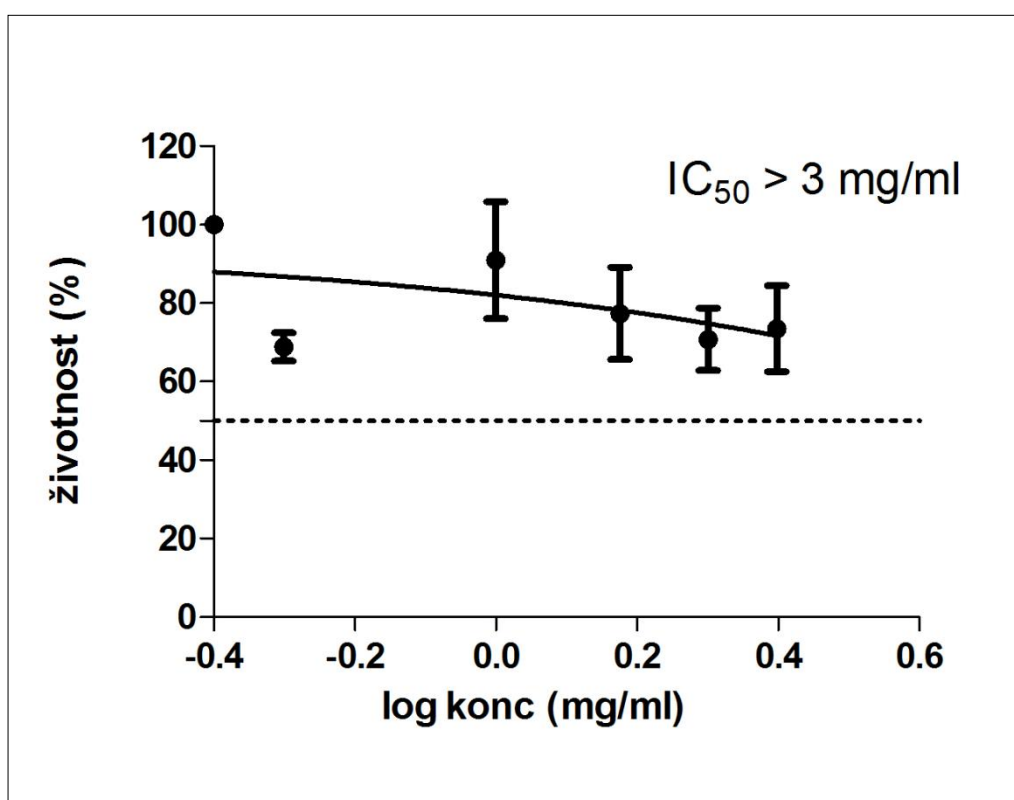
Chi-2-SP		
Koncentrace (mg/ml)	Log konc. (mg/ml)	Životnost (%)
0,5	-0,3	83,5
1	0	88,8
1,5	0,2	76,4
2	0,3	71,9
2,5	0,4	-7,0
3	0,5	-5,8



Obr. 14. Závislost životnosti buněk na koncentraci testované látky Chi-2-SP

Tabulka 11. Životnost buněk vzhledem ke koncentraci testované látky Chi-7

Chi-7		
Koncentrace (mg/ml)	Log konc. (mg/ml)	Životnost (%)
0,5	-0,3	68,9
1	0	91,0
1,5	0,2	77,4
2	0,3	70,8
2,5	0,4	73,5



Obr. 15. Závislost životnosti buněk na koncentraci testované látky Chi-7

Tabulka 12. Hodnoty IC_{50} testovaných chitosanů za použití metody CellTiter 96 u HepG2 buněk

Testovaná látka	IC_{50} (mg/ml)
Chi-2-SP	2,087
Chi-7	> 3

6 DISKUSE

První skupinou testovaných vývojových látek byly deriváty 5,6-substituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů v současnosti intenzivně studované pro jejich antibakteriální, antituberkulotickou a antifungální aktivitu (Kopecký et al., 2010). K posouzení toxicity těchto látek byl vybrán komerčně dostupný test toxicity CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (zkráceně CellTiter 96). Jedná se o měření redukce tetrazolového barviva MTS na formazan, který je následně kolorimetricky stanovován. Při tomto stanovení je sledován metabolický stav živých buněk. Jako buněčný model, na kterém byla zkoumána cytotoxicita látek, byla z dostupných modelů vybrána standardní buněčná linie lidských jaterních buněk HepG2.

Jako měřítko cytotoxicity byl stanoven parametr IC_{50} prezentující inhibiční koncentraci, která je nutná ke snížení buněčné populace právě na 50% hodnoty maximální (kontrolní) životnosti a umožňuje tak potřebnou kvantifikaci k porovnání účinku mezi jednotlivými testovanými látkami. Abychom mohli hodnoty IC_{50} stanovit, museli jsme látky testovat v širokém rozmezí koncentrací a optimalizovat metodiku testu. Optimální se ukázala koncentrace 10 000 buněk ve 100 μ l buněčného média oproti zkoušené vyšší koncentraci 10 000 buněk v 50 μ l buněčného média. Lepších výsledků bylo dosaženo při prodloužení inkubační doby s činidlem z 1h na 2h. Prodloužením inkubační doby v určitém rozmezí lze dosáhnout zvýšení citlivosti metody.

Stanovení cytotoxicity komplikovala špatná rozpustnost testovaných látek ve vodě. Pro přípravu roztoků látek ze skupiny ZIPů jsme proto použili DMSO a ve velmi malých objemech tyto roztoky přidali k buňkám tak, aby bylo dosaženo požadovaných inkubačních koncentrací. Při dodržení pravidla, že koncentrace DMSO v inkubační směsi nepřesahuje 1%, nemá toto rozpouštědlo toxický vliv na použitý buněčný preparát. Stabilitu roztoku a stav buněk jsme kontrolovali pod mikroskopem a po dokončení inkubace byla provedena fotodokumentace vybraného vzorku.

Hodnoty IC_{50} se podařilo za pomoci testu CellTiter 96 stanovit u všech čtyř testovaných ZIPů jejich odečtením ze závislostních grafů vytvořených programem GraphPad Prism 5.02. Toxické působení vybraného preparátu testované látky ZIP-34 po 24 hod inkubace potvrzují snímky pořízené

světelnou mikroskopií a odpovídají tak hodnotám naměřeným v experimentu. Pořadí toxicity testovaných látek lze vyjádřit následující posloupností od nejvíce cytotoxické po nejméně cytotoxickou látku: ZIP-128 > ZIP-130 > ZIP-34 > ZIP-136. Celkově ale provedené testy jasně a konzistentně prokázaly, že hodnoty IC_{50} zkoumaných látek jsou podobné a řádově se vzájemně neodlišují.

Vzhledem k 5-10% výskytu léky indukované hepatotoxicity u dnes používaných antituberkuloticky účinných léčiv, jsou snahy o vývoj nových nosičů pro tato léčiva s cílem získat proléčivo s nižším hepatotoxickým potenciálem, než vykazují samotná antituberkulotická individua. Takové prekurzory představuje druhá skupina testovaných látek, jež vznikly navázáním léčiv izoniazidu a pyrazinamidu na modifikovaný polymerní nosič chitosan (Vavříková et al., 2011).

Zkoumali jsme cytotoxický potenciál dvou antituberkuloticky účinných derivátů chitosanu za využití metody CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Při předběžných zkouškách byla u této skupiny látek testována fluorescenční metoda MultiTox-Fluor Multiplex cytotoxicity Assay, která se však pro interakce testovaných látek s činidlem ukázala jako nevhodná. Za buněčný model byly stejně jako u předchozí skupiny zkoumaných látek použity buňky HepG2. Z výsledků předběžných pokusů byla pro tyto látky jako nejvhodnější koncentrace zvolena koncentrace 10 000 buněk v 50 μ l buněčného média.

Celkově lze ze zjištěných hodnot IC_{50} u obou testovaných derivátů chitosanu usuzovat na jejich relativně nízkou cytotoxicitu. U Chi-7 se dokonce nepodařilo tento toxikologický parametr určit, neboť ve zkoumaném rozsahu koncentrací neprojevil signifikantní cytotoxické působení. Chitosan a jeho deriváty by tak mohly být slibným materiálem vhodným pro použití při kompenzaci toxicity a pro ochranu jater v průběhu podávání antituberkulotických léčiv.

Ve srovnání se samotnými antituberkulotiky jsou nalezené cytotoxicity konjugátů s chitosanem nižší. Zjištěná hodnota IC_{50} u HepG2 buněk byla pro pyrazinamid 0,44 mg/ml a pro izoniazid 1,04 mg/ml (Vavříková et al., 2011). Tyto údaje ukazují, že cytotoxicita těchto látek nenavázaných na chitosan, je

zřetelně vyšší než u jejich zkoumaných chitosanových konjugátů. Ze získaných údajů tedy vyplývá, že zkoumané konjugáty antituberkulotik s chitosanem by mohly skutečně mít nižší hepatotoxický potenciál než výchozí antituberkulotické látky. Předpokladem pro další využití konjugátů antituberkulotik je zachování antimikrobiální účinnosti. Z publikovaných údajů se zdá, že tyto látky mají dostatečnou antituberkulotickou aktivitu zachovanou (Vavříková et al., 2011) a mohly by tak být zařazeny do dalšího farmakologického hodnocení.

7 SHRNUTÍ ZÁVĚRŮ PRÁCE

1. Pro stanovení cytotoxicity byla vybrána a optimalizována *in vitro* metoda s využitím standardní linie lidských jaterních buněk HepG2. Jako parametr pro posouzení cytotoxicity testovaných látek byly stanovovány hodnoty IC_{50} .
2. S pomocí buněčného modelu byla stanovena cytotoxicita potenciálních antiinfekčních látek ze skupiny nově syntetizovaných derivátů substituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů (ZIP-34, ZIP-128, ZIP-130 a ZIP-136). Hodnoty IC_{50} se podařilo určit u všech čtyř látek z této skupiny. Nejvyšší toxicitu pro jaterní buňky vykazoval ZIP-128, nejnižší ZIP-136. Získané výsledky ukázaly, že hodnoty IC_{50} studovaných ZIPů jsou relativně blízké.
3. Byla stanovena cytotoxicita potenciálně antiinfekčních látek ze skupiny nově syntetizovaných derivátů chitosanu s navázanými antituberkuloticky účinnými látkami (Chi-2-SP a Chi-7). Cytotoxický účinek derivátů chitosanu byl relativně nízký, hodnotu IC_{50} u testovaného derivátu chitosanu Chi-7 se pro nízkou toxicitu nepodařilo kvantifikovat. Studované deriváty lze tedy na základě těchto údajů pokládat za relativně netoxické.

8 ZKRATKY

CYP	cytochrom P450
GST	glutathion S-transferáza
UGT	UDP-glukuronyltransferáza
MTS	[3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium]
PES	fenazin etosulfát
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADH	redukovaný nikotinamidadeninukleotid
SDS	dodecyl síran sodný
DMSO	dimetyl sulfoxid
OCCM	O-karboxymetylovaný chitosan
NCCS	N-sukcinylovaný chitosan
PBS	fosfátový pufr
Mr	relativní molekulová hmotnost

9 POUŽITÁ LITERATURA

Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le Charpentier, T., Lanquouët, S., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C., Guillouzo, A.: Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos.* 2006; 34: s. 75-83

Anonym: CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Technical Bulletin. 2009, s. 1-12

Aranaz, I., Harris, R., Heras, A.: Chitosan amphiphilic derivatives. *Chemistry and Applications. Curr Org Chem.* 2010; 14: s. 308, 309

Bradlaw, J.A.: Evaluation of drug and chemical toxicity with cell culture systems. *Fundam Appl Toxicol.* 1986; 6: s. 600

Dambach, D.M., Andrews, B.A., Moulin, F.: New technologies and screening strategies for hepatotoxicity: use of in vitro models. *Toxicol Pathol.* 2005; 33: s. 17-26

Doležal, M.: Biologicky aktivní pyraziny přírodního a syntetického původu. *Chem. Listy.* 2006; 100: s. 959-963

Donato, M.T., Lahoz, A., Castell, J.V., Gómez-Lechón, M.J.: Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Curr Drug Metab.* 2008; 9: s. 1-3

Fariss, M.V., Chan, C.B., Patel, M., Van Houten, B., Orrenius, S.: Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol Interv.* 2005; 5: s. 94-111

Gómez-Lechón, M.J., Lahoz, A., Gombau, L., Castell, J.V., Donato, M.T.: In vitro evaluation of potential hepatotoxicity induced by drugs. *Curr Pharm Des.* 2010; 16: s. 1967

Hawksworth, G.M.: Advantages and disadvantages of using human cells for pharmacological and toxicological studies. *Hum Exp Toxicol.* 1994; 13: s. 568-569

Kato, Y., Onishi, H., Machida, Y.: Evaluation of N-succinyl-chitosan as a systemic long-circulating polymer. *Biomaterials.* 2000; 21: s. 1579-1585

Kato, Y., Onishi, H., Machida, Y.: N-succinyl-chitosan as a drug carrier: water-insoluble and water-soluble conjugates. *Biomaterials.* 2004; 25: s. 907-915

Kopecký, K., Zimčík, P., Nováková, V., Doležal, M.: In vitro antiinfekční aktivita 5,6-substituovaných derivátů pyrazin-2,3-dikarbonitrilu. *Chem Listy.* 2010; 104: s. 1094

Morissette, G., Moreau, E., C-Gaudreault, R., Marceau, F.: Massive cell vacuolization induced by organic amines such as procainamide. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 310: s. 395-406

O'Brien, P., Haskins, J.R.: In vitro cytotoxicity assessment. *Methods Mol Biol.* 2006; 356: s. 415-421

O'Brien, P., Irwin, W., Diaz, D., Howard-Cofield, E., Krejsa, C.M., Slaughter, M.R., Gao, B., Kaludercic, N., Angeline, A., Bernardi, P., Brain, P., Hougham, C.: High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Arch Toxicol.* 2006; 80: s. 580-604

Park, B.K., Kitteringham, N.R., Maggs, J.L., Pirmohamed, M., Williams, D.P.: The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005; 45: s. 177-202

Posonda, X., Pareja, E., Gómez-Lechón, M.J., Fabra, R., Carrasco, E., Trullengue, R., Castell, J.V.: Drug biotransformation by human hepatocytes. In vitro/in vivo metabolism by cells from the same donor. *J Hepatol.* 2001; 34: s. 19-25

Řeháčková, R.: Stanovení cytotoxicity vybraných skupin xenobiotik, Rigorózní práce. Univerzita Karlova v Praze. 2010; s. 11-17

Santhosh, S., Sini, T.K., Anandan, R., Mathew, P.T.: Hepatoprotective activity of chitosan against isoniazid and rifampicin-induced toxicity in experimental rats. *Eur J Pharmacol.* 2007; 572: s. 69

Sharma, S.K.: Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. *Infect Genet Evol.* 2004; 4: s. 167-170

Slaughter, M.R., Thakkar, H., O'Brien, P.J.: Effect of diquat on the antioxidant system and cell growth in human neuroblastoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002; 178: s. 63-70

Tostmann, A., Boeree, M.J., Peters, W.H., Roelofs, H.M., Aarnoutse, R.E., van der Ven, A.J., Dekhuijzen, P.N.: Isoniazid and its toxic metabolite hydrazine induce in vitro pyrazinamide toxicity. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 31: s. 577-580

Vavříková, E., Mandíková, J., Trejtnar, F., Horvatic, K., Boszec, S., Stolaříková, J., Vinšová, J.: Cytotoxicity decreasing effect and antimycobacterial activity of chitosan conjugated with antituberculous drugs. *Carbohydr Polym*. 2011; 83: s. 1901-1907

Vinšová, J., Vavříková, E.: Recent advances in drugs and prodrugs design of chitosan. *Curr Pharm Des*. 2008; 14: s. 1311, 1314

Waring, P.: Redox active calcium ion channels and cell death. 2005; 434: s. 33-42

Xu, J.J., Diaz, D., O'Brien, P.J.: Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. *Chem Biol Interact*. 2004; 150: s. 115-128

Yue, J., Peng, R., Chen, J., Liu, Y., Dong, G.: Effect of rifampin on CYP2E1-dependent hepatotoxicity of isoniazid in rats. *Pharmacol res*. 2009; 59: s. 112

Zeng, L., Qin, C., Wang, W., Chi, W., Li, W.: Absorption and distribution of chitosan in mice after oral administration. *Carbohydr Polym*. 2008; 71: s. 435